

SOSTANZE D'ABUSO BASICHE su sangue intero in GC-MS – Cod. GC89010

(Morfina, Codeina, 6-MAM, Cocaina, BEG, Cocaetilene, Ecgonina metil-estere, Metadone, EDDP, Buprenorfina, Norbuprenorfina)

Metodo di conferma in GC-MS

INTRODUZIONE

La determinazione delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici viene generalmente effettuata in prima istanza usando tecniche immunometriche che si avvalgono della reazione antigene-Anticorpo e successiva marcatura con vari reagenti. Queste metodologie sono considerate di screening. Poiché tali tecniche non possono escludere falsi positivi, le positività allo screening devono essere confermate con tecnica alternativa, generalmente con tecnica cromatografica sia Gassosa (GC) che Liquida (LC) entrambe accoppiate con detector di Massa (MS).

Il presente metodo consente di determinare la Morfina, la Codeina, la 6-Monoacetilmorfina, la Benzoilecgonina, la Cocaina, il Metadone, l'EDDP, la Norbuprenorfina, la Buprenorfina, la Cocaetilene, l' Ecgonina Metil Estere con lettura in GC-MS.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

N° 005	Sostanze d'Abuso basiche su sangue intero	08/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Morfina**, la **Codeina**, la **6-Monoacetilmorfina**, la **Cocaina**, la **Beg**, la **Cocaetilene**, il **Metadone**, la **Buprenorfina**, l'**EDDP**, la **Norbuprenorfina**, l'**Ecgonina metil-estere** previa purificazione SPE del sangue e lettura in GC-MS.

Il metodo è stato validato secondo i criteri stabiliti a livello internazionale dalla FDA e dall'ICH.

Concentrazioni di sostanze in urina e sangue che definiscono i **REQUISITI MINIMI DI PRESTAZIONE** per l'analisi di conferma, a scopo tossicologico-forense, mediante tecniche cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa.

Classe di sostanze o sostanza	Il metodo deve essere in grado di confermare (ng/ml)
Oppiacei	
<i>morfina totale*</i>	2
<i>codeina totale*</i>	2
<i>6-acetilmorfina</i>	2
Cocaina	
<i>cocaina</i>	2
<i>benzoilecgonina</i>	2
<i>cocaetilene</i>	2
<i>nor-cocaina</i>	2
Amfetamina e congeneri	
<i>amfetamina</i>	2
<i>metamfetamina</i>	2
3,4-Metilendirossimetamfetamina e congeneri	
<i>MDMA</i>	2
<i>MDA</i>	2
<i>MDEA</i>	2
<i>MBDB</i>	2
Metadone	
<i>metadone</i>	2
<i>EDDP</i>	2
Cannabinoidi	
<i>THC</i>	1
<i>11-OH-THC</i>	0,1
<i>THC-COOH</i>	2
Buprenorfina	
<i>buprenorfina totale*</i>	2
<i>norbuprenorfina totale*</i>	2

* il valore è riferito al campione sottoposto a idrolisi.

Linee Guida per Strutture dotate di Laboratori per gli accertamenti di Sostanze d'Abuso con Finalità Tossicologico-Forensi e Medico-Legali

Revisione n. 5 del 29 maggio 2017.

ANALITA	Accuratezza intra-giorno			Precisione intra-giorno			Accuratezza inter-giorno		
	(Errore %)			(CV%)			(Errore %)		
	Calibratore			Calibratore			Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore
	Ci 2,5 ng/ml	Cm 10 ng/ml	Cs 50 ng/ml	Ci 2,5 ng/ml	Cm 10 ng/ml	Cs 50 ng/ml	Ci 2,5 ng/ml	Cm 10 ng/ml	Cs 50 ng/ml
BENZOILECGONINA	13,7	7,2	4,9	2,1	2,3	4,4	14,8	10,6	6,5
COCAETILENE	8,0	4,1	6,1	5,9	2,0	5,2	10,7	8,8	6,6
COCAINA	7,0	4,4	2,3	1,2	3,0	3,2	11,9	7,5	4,9
MORFINA	7,9	4,9	3,4	4,6	5,4	1,7	11,6	8,6	6,2
6-MAM	7,3	3,4	5,0	5,5	3,7	2,3	10,6	6,9	6,4
ECGONINA METIL ESTERE	6,7	6,8	4,2	3,0	3,7	5,6	10,3	9,7	5,2
CODEINA	8,7	3,7	3,8	4,1	0,2	2,9	11,7	8,4	6,2
METADONE	4,4	1,0	3,0	4,9	1,3	1,6	6,5	3,8	6,1
EDDP	6,8	4,2	6,0	6,2	5,6	7,0	8,3	5,5	7,7
	Ci 1,25 ng/ml	Cm 5 ng/ml	Cs 25 ng/ml	Ci 1,25 ng/ml	Cm 5 ng/ml	Cs 25 ng/ml	Ci 1,25 ng/ml	Cm 5 ng/ml	Cs 25 ng/ml
NORBUPRENORFINA	9,1	8,9	9,2	6,1	2,2	6,7	11,7	11,8	10,3
BUPRENORFINA	7,7	5,5	2,8	2,0	2,1	2,9	12,3	7,0	6,7

ANALITA	(Coefficiente di correlazione R2) $\pm$ deviazione standard	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
BENZOILECGONINA	0,9992 $\pm$ 0,0001	0,16	0,5
COCAETILENE	0,9993 $\pm$ 0,0007	0,16	0,5
COCAINA	0,9996 $\pm$ 0,0002	0,16	0,5
MORFINA	0,9997 $\pm$ 0,0004	0,16	0,5
6-MAM	0,9988 $\pm$ 0,0003	0,16	0,5
ECGONINA METIL ESTERE	0,9994 $\pm$ 0,0002	0,16	0,5
CODEINA	0,9995 $\pm$ 0,0005	0,16	0,5
NORBUPRENORFINA	0,9991 $\pm$ 0,0004	0,08	0,25
METADONE	0,9994 $\pm$ 0,0002	0,16	0,5
EDDP	0,9999 $\pm$ 0,0001	0,16	0,5
BUPRENORFINA	0,9994 $\pm$ 0,0003	0,08	0,25

ANALITA	Recupero (%)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
BENZOILECGONINA	103,57	103,29	100,18
COCAETILENE	95,11	96,80	104,16
COCAINA	99,55	104,92	100,99
MORFINA	86,18	107,43	93,20
6-MAM	80,57	99,69	96,30
ECGONINA METIL ESTERE	88,16	80,31	87,76
CODEINA	89,29	115,89	119,44
NORBUPRENORFINA	107,13	109,69	97,53
METADONE	100,95	106,93	97,39
EDDP	100,11	108,32	119,51
BUPRENORFINA	100,34	92,87	94,12

Contenuto della Confezione (50 test) :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C, eccetto **Reagente A**.

Stoccare a – 20 °C

Reagente A – Standard interni deuterati, **1 x 750 ul**

Reagente B – Soluzione Tampone, **1 x 300 ml**

Reagente C – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 3, **1 x 250 ml**

Reagente D – Soluzione Condizionamento 2, **1 x 100 ml**

Reagente E – Soluzione Lavaggio 1, **1 x 50 ml**

Reagente F – Soluzione Lavaggio 2, **1 x 150 ml**

Reagente G – Soluzione Lavaggio 4, **1 x 60 ml**

Reagente H – Soluzione Eluente, **1 x 100 ml**

Reagente I – Soluzione Derivatizzante, **4 x 1000 ul**

Stoccare a Temperatura ambiente prima e dopo l'apertura. Vedi Avvertenze

Reagente L – Soluzione Test Basiche, **1 x 500 ul**

Vedi Avvertenze

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 0, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 1, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 2, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 3, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 4, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 5, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 6, 3 x 1 ml

Codice LC89016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Colonnine Clean-up, 50 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento GC-MS
Computer gestionale
Bagno ultrasuoni

Dotazione opzionale :

Autocampionatore

Modalità di prelievo ematico :

Provetta con anticoagulante EDTA
**Stabile per circa 4 settimane a 2
– 8 °C o 4 mesi a –20°C.**

PROCEDURA PREANALITICA :

FASE 1 : In una provetta in pyrex con tappo a vite prelevare 50 µl di **Reagente L – Soluzione Test Basiche**

Conservazione Test: una volta aperta la vial prelevarne il volume necessario, richiuderla e conservarla a -20 °C.

FASE 2 : Portare a secco con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

FASE 3 : Aggiungere nella provetta 40 µl di **Reagente I – Soluzione Derivatizzante**

Chiudere ermeticamente la provetta

Porre al vortex per 30 secondi

FASE 4 : Porre in stufa a 70°C per 30 minuti

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

FASE 5 : Trasferire tutto il campione in vials di vetro con riduttore di volume per auto campionatore

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2 µl di questa soluzione appena preparata nel Gas Cromatografo per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa delle sostanze d'abuso che devono essere simili a quelli riportati nelle Fig. sottostanti. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

PROCEDURA ANALITICA

Diluire il **Reagente A – Standard interni deuterati** 1:1 con Acqua di grado HPLC, preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica. E' possibile modulare, all'occorrenza, il fattore di diluizione a seconda della sensibilità dello strumento in uso.

N.B.: tale diluizione va preparata fresca ad ogni seduta analitica

FASE 1 : Preparazione del Campione

Dispensare nelle provette da 10 ml in sequenza:

	Calibratore – Livello 0	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Calibratore – Livello 6	Controlli	Campione
Calibratore – Livello 0	1000 µl								
Calibratore – Livello 1		1000 µl							
Calibratore – Livello 2			1000 µl						
Calibratore – Livello 3				1000 µl					
Calibratore – Livello 4					1000 µl				
Calibratore – Livello 5						1000 µl			
Calibratore – Livello 6							1000 µl		
Controlli								1000 µl	
Campione									1000 µl
Reagente A – Std interni deuterati (diluito 1:1 in Acqua grado HPLC)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Reagente B – Soluzione Tampone	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl	6000 µl

Tappare la provetta e porre al Vortex per 30 sec.

FASE 2 : Porre nel bagno ad ultrasuoni per 15 min

FASE 3 : Centrifugare a 4.000 giri per 30 minuti per la separazione completa delle due fasi

ESTRAZIONE DEGLI ANALITI

FASE 4 : Condizionamento delle colonnine SPE

Preparare un numero di colonnine corrispondenti alla somma dei calibratori, controlli e campioni incogniti.

- Aggiungere 2 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato senza portare a secco la colonnina
- Aggiungere 2 ml di **Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato senza portare a secco la colonnina

FASE 5 : Caricare 6 ml del surnatante dei calibratori, controlli e campioni incogniti, preparati nella fase 3 nelle colonnine condizionate e scaricare ad un flusso di 1 ml / minuto (goccia a goccia)

FASE 6 : Lavaggio delle colonnine SPE

- Lavare con 1 ml di **Reagente E – Soluzione di Lavaggio 1**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 3 ml di **Reagente F – Soluzione di Lavaggio 2**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato, portando a secco con un flusso d'aria
- Lavare con 2 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 1 ml di **Reagente G – Soluzione di Lavaggio 4**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato, portando a secco con un flusso d'aria

ELUIZIONE e DERIVATIZZAZIONE DEGLI ANALITI

Eluire **rigorosamente** in provette di vetro

FASE 7 : Eluire con 1.5 ml di **Reagente H – Soluzione Eluente**. *Portare a secco con un leggero flusso d'aria.*

Raccogliere l'eluato su provette in pyrex con tappo a vite

Portare a secco l'eluato con evaporatore o flusso di azoto (Temperatura massima 40°C)

FASE 8 : Aggiungere in ogni provetta 40 µl di **Reagente I – Soluzione Derivatizzante**

Tappare ermeticamente la provetta e porre al Vortex per 30 sec.

Porre in stufa a 70°C x 30 min

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

FASE 9 : Trasferire il derivatizzato nelle vial con riduttore di volume ed iniettare 2 µl nel GC-MS

N.B: Il campione è stabile 24 ore a 2-8 C°

SOSTANZE D'ABUSO BASICHE SU SANGUE INTERO - Avvertenze

REAGENTE L: SOLUZIONE TEST

Morfina Codeina 6-Monoacetilmorfina Ecgonina Metil Estere Norbuprenorfina Metadone BEG Cocaetilene Cocaina Buprenorfina EDDP	Circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE I: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a Temperatura Ambiente.

SETTAGGIO DEL GAS-CROMATOGRAFO :

- Colonna Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm 0,25 µm (condizionata)
- Temperatura iniettore 250 °C
- Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 20
0 min: OFF
1 min: ON split 100
3 min: ON split 20
- Temperatura 120 °C x 3.25 minuti + 20 °C/min fino a 250 °C x 1 minuto + 40 °C/min fino a 300 °C x 12 minuti (corsa 24 minuti)
- Flusso in colonna (Elio): 1 ml/min

SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA (4000) :

- Range di Massa 70 – 540
- Temperatura della Massa: 190 °C;
- Temperatura Transfer Line: 270 °C;
- Temperatura Manifold: 80 °C
- Filamento on: 3 minuti - Filamento off: 24 minuti

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm 0,25 µm

Seguire le prescrizioni del costruttore.
Non condizionare la (le) colonna/e se attaccata al Detector di Massa.

PULIZIA DELLA COLONNA E DELLA SIRINGA

Iniettare ACETONE prima e dopo la seduta analitica. Lavare la siringa prima dell'iniezione con ACETONE (4 volte) e dopo l'iniezione con ACETONE (4 volte).
CONTROLLARE LA BUONA FUNZIONALITA' DELLA SIRINGA PRIMA DI OGNI SEDUTA.

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC89016	Calibratore su sangue per Sostanze D'abuso	7 x 2 x 1 ml
LC89019	Controllo multiparametrico per Sostanze d'abuso – Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 Pz
S29046U	Tappi per Vial standard di vetro da 2 ml	1 x 100 Pz
S24717	Riduttori di volume per vials da 2 ml	1 x 100 Pz
Z-1636/26	Provette in Pyrex da 10 ml con tappo SWL	1 x 40 Pz
S13623	Colonna Restek Rxi-5SILms (30 m x 0,25 mm – 0,25 µm)	1 Pz
ZRE24533	Siringa Hamilton da 50 µl	1 Pz

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

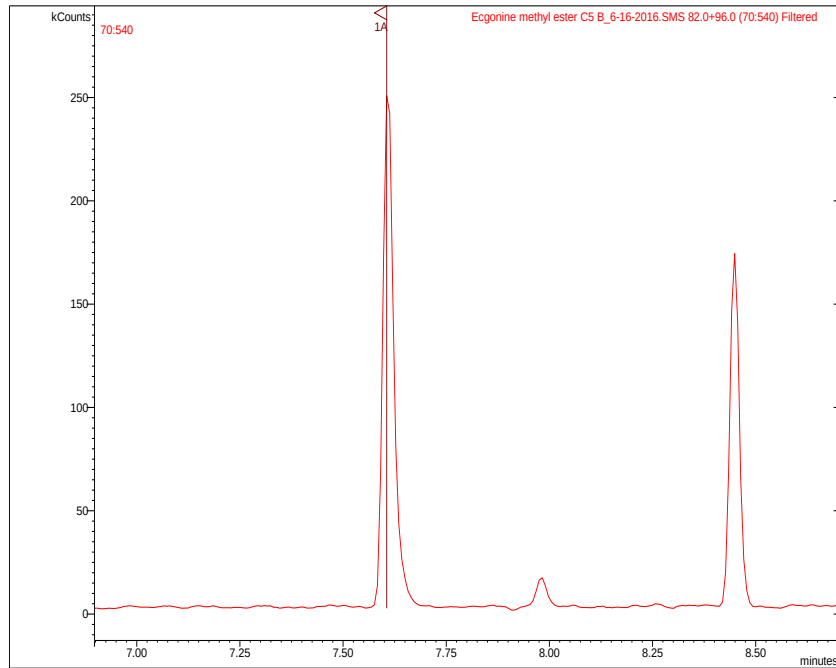


Figura 1: EME; RT 7.606

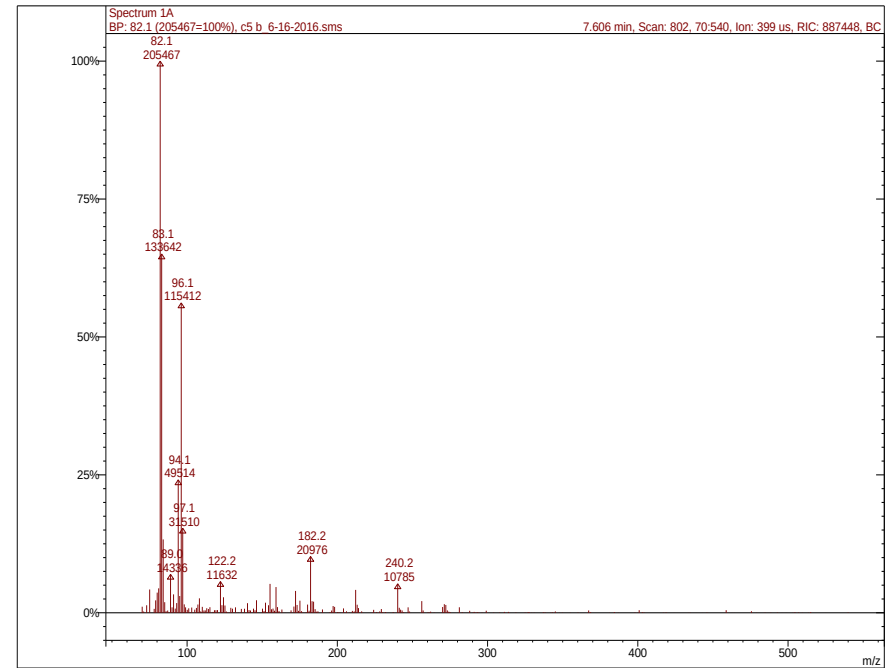


Figura 2: Spettro di massa EME; Ioni molecolari 82 - 96

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

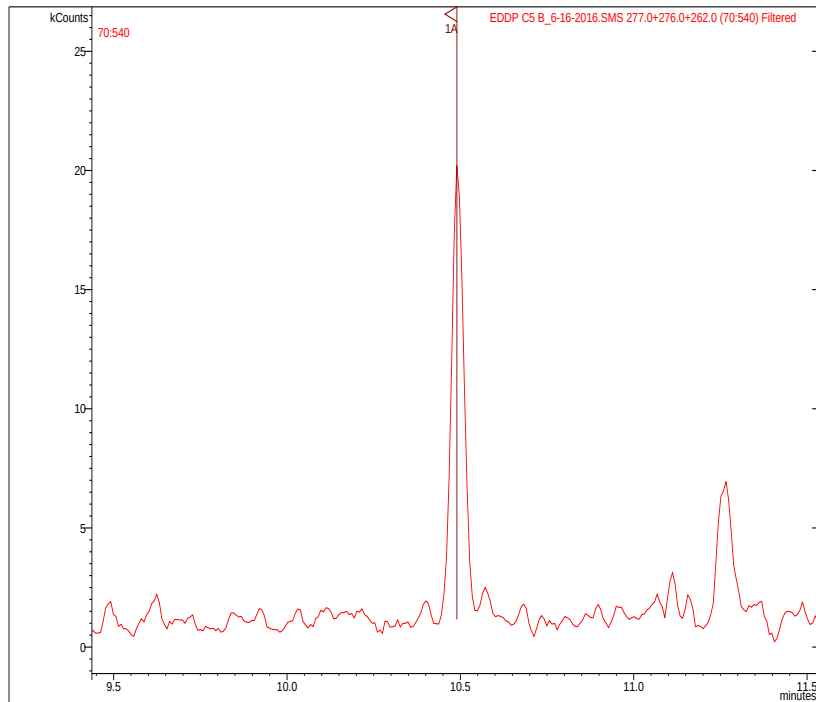


Figura 3: EDDP; RT 10.490

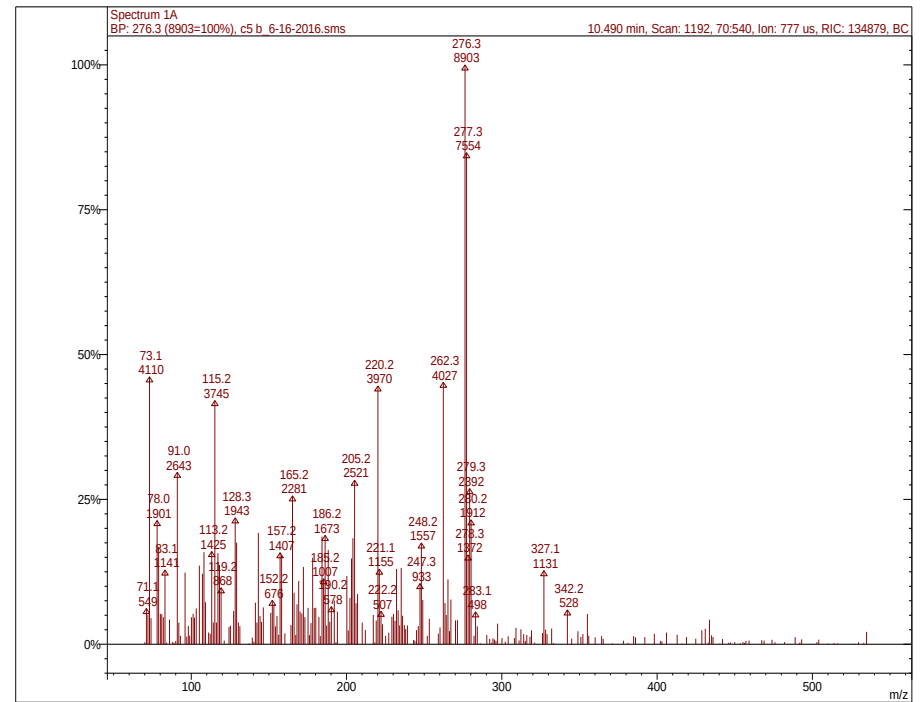


Figura 4: Spettro di massa EDDP; Ioni molecolari 276 - 277 - 262

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

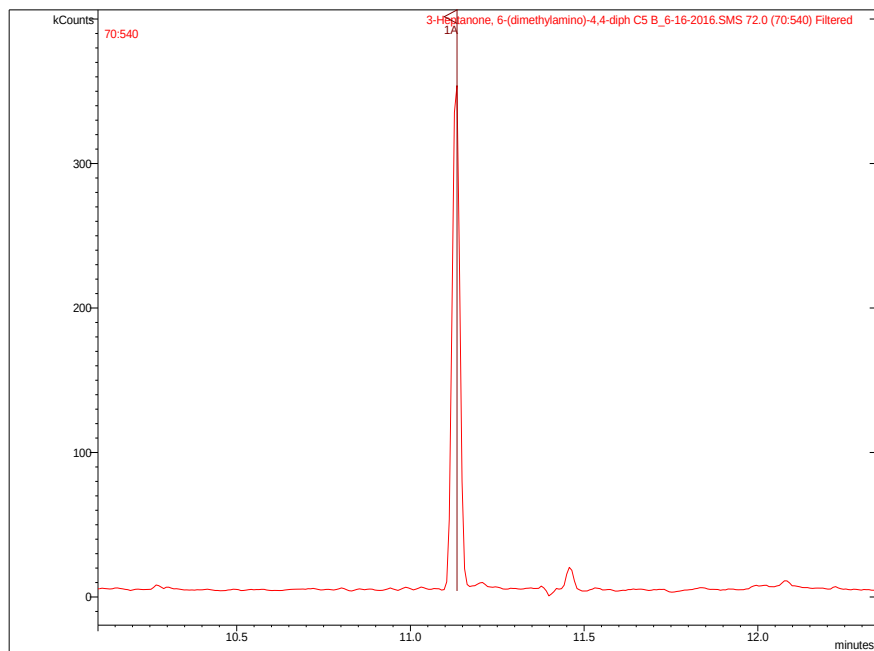


Figura 5: Metadone; RT 11.134

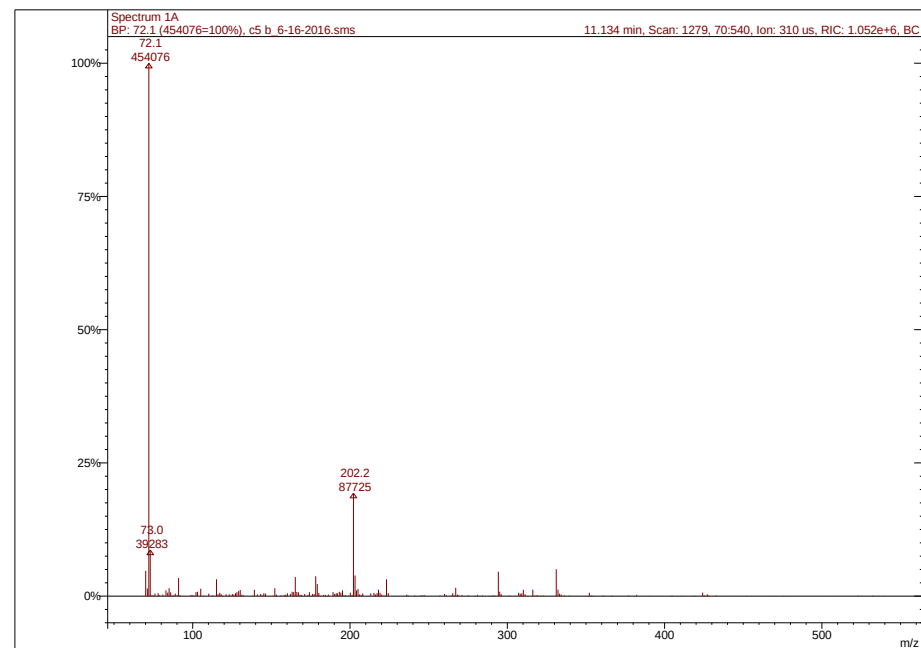


Figura 6: Spettro di massa Metadone; Ioni molecolari 72 – 165 - 294

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

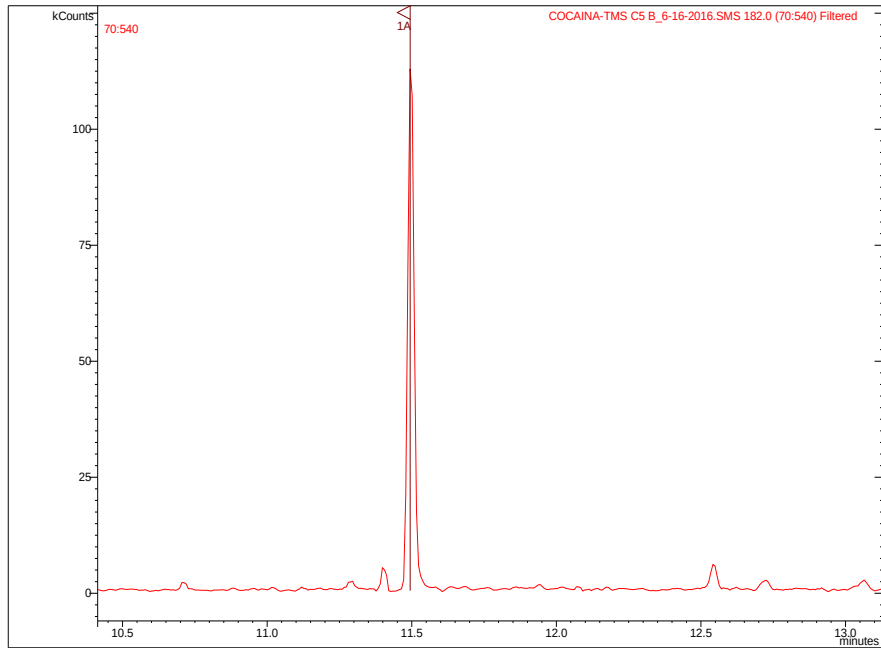


Figura 7: Cocaina; RT 11.494

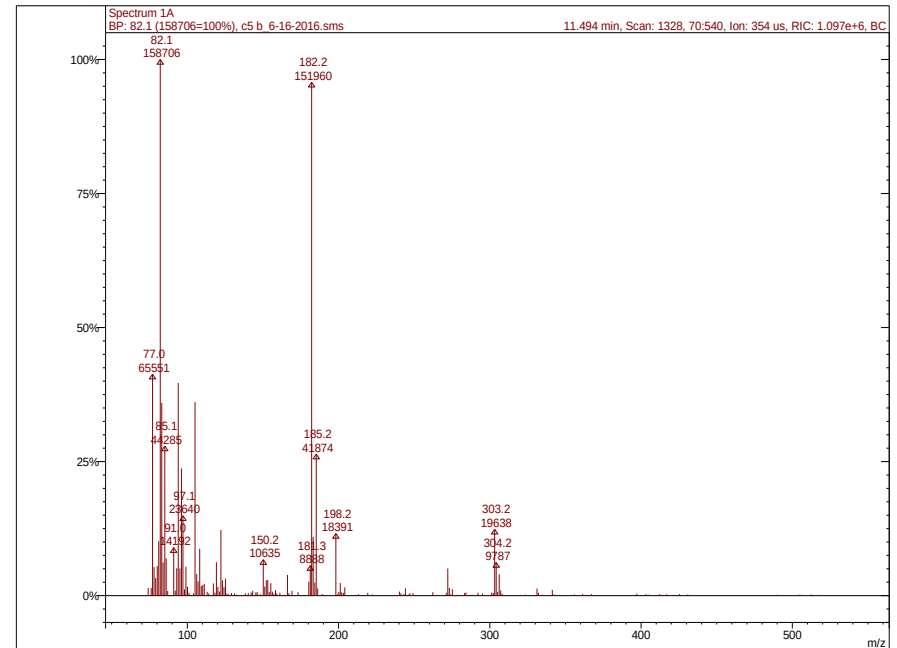


Figura 8: Spettro di massa Cocaina; Ioni molecolari 182 - 82 - 94

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

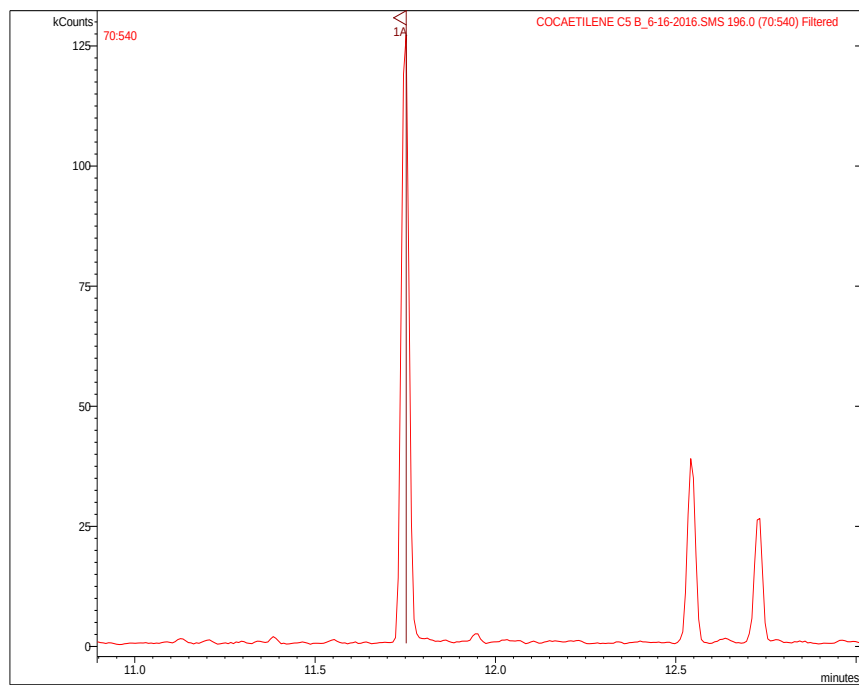


Figura 9: Cocaetilene; RT 11.752

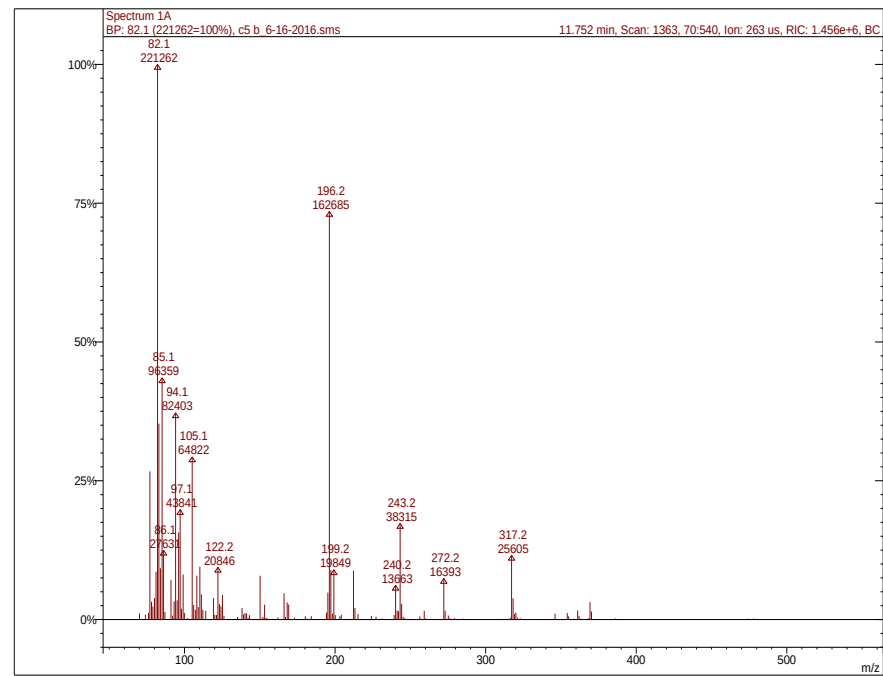


Figura 10: Spettro di massa Cocaetilene; Ioni molecolari 196 - 82 - 94

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

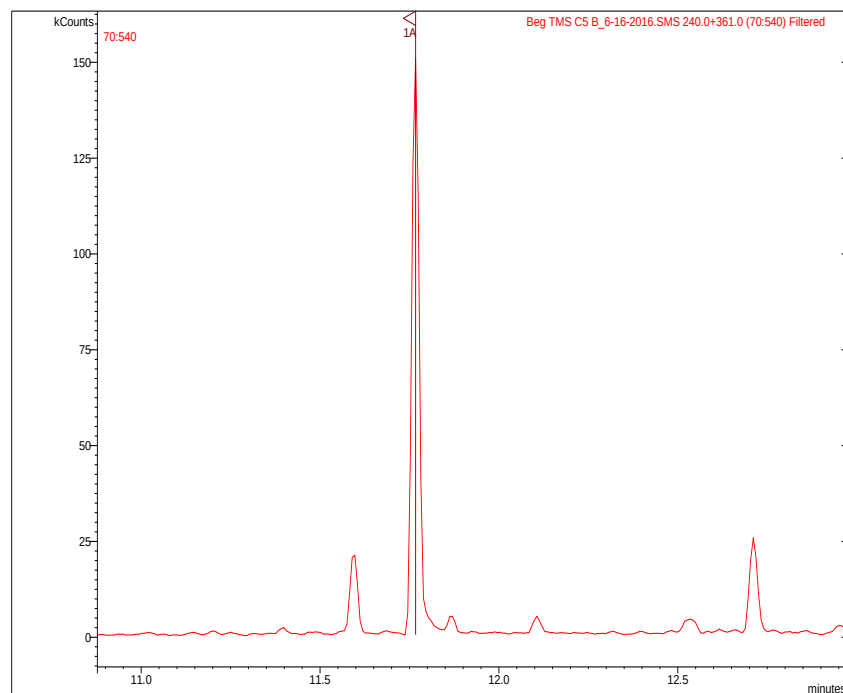


Figura 11: BEG; RT 11.767

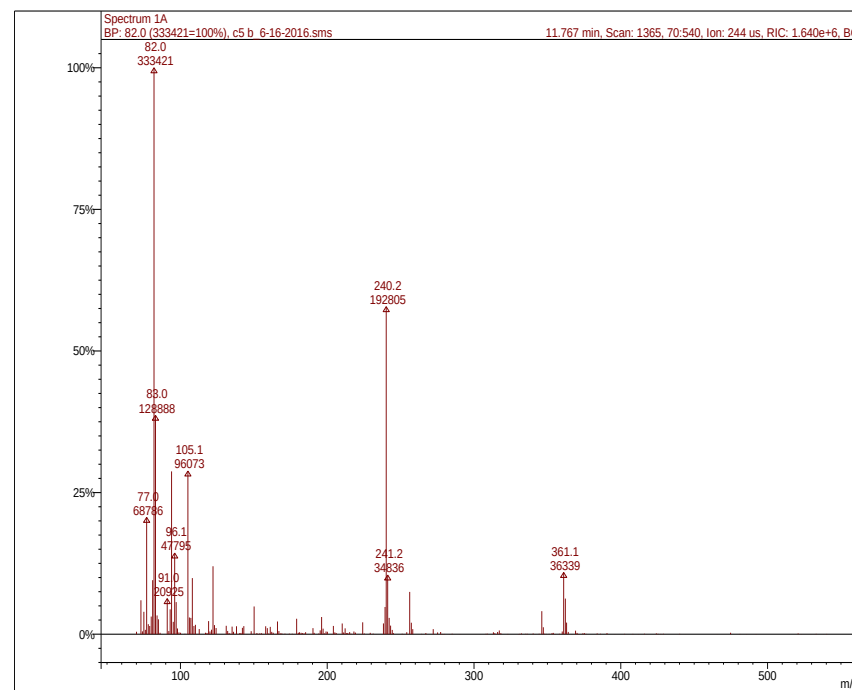


Figura 12: Spettro di massa; Ioni molecolari 240 - 361 - 82

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

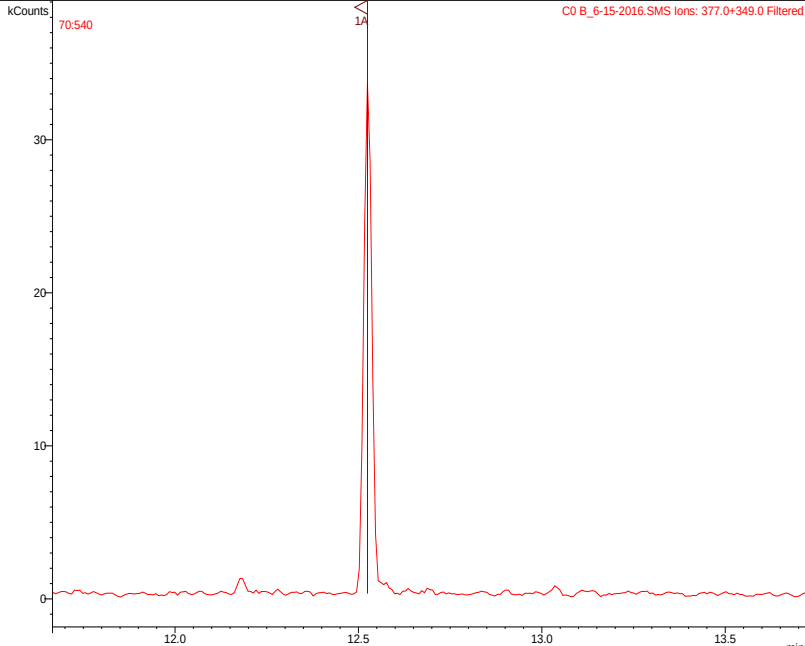


Figura 13: Codeína; RT 12.542

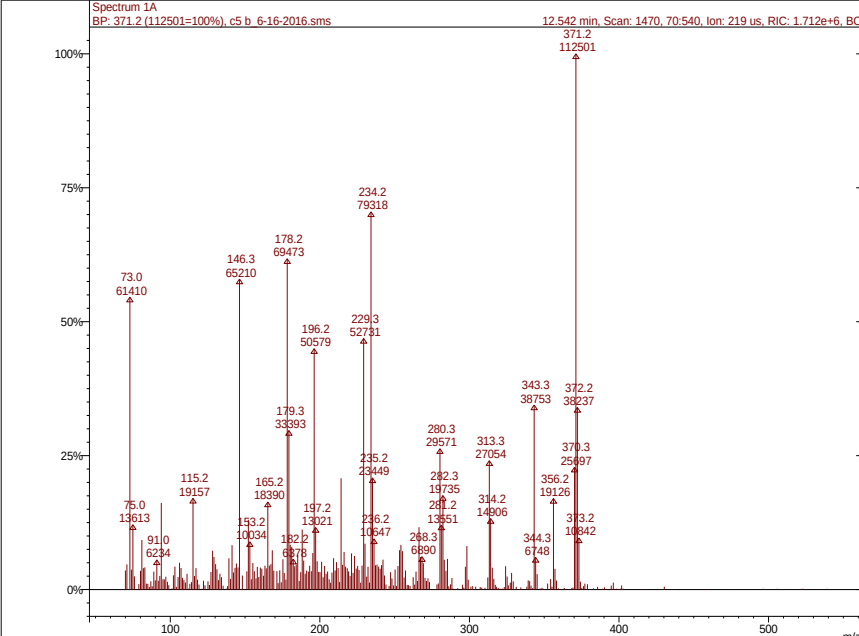


Figura 14: Spettro di massa Codeina; Ioni molecolari 371 - 234 - 343

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

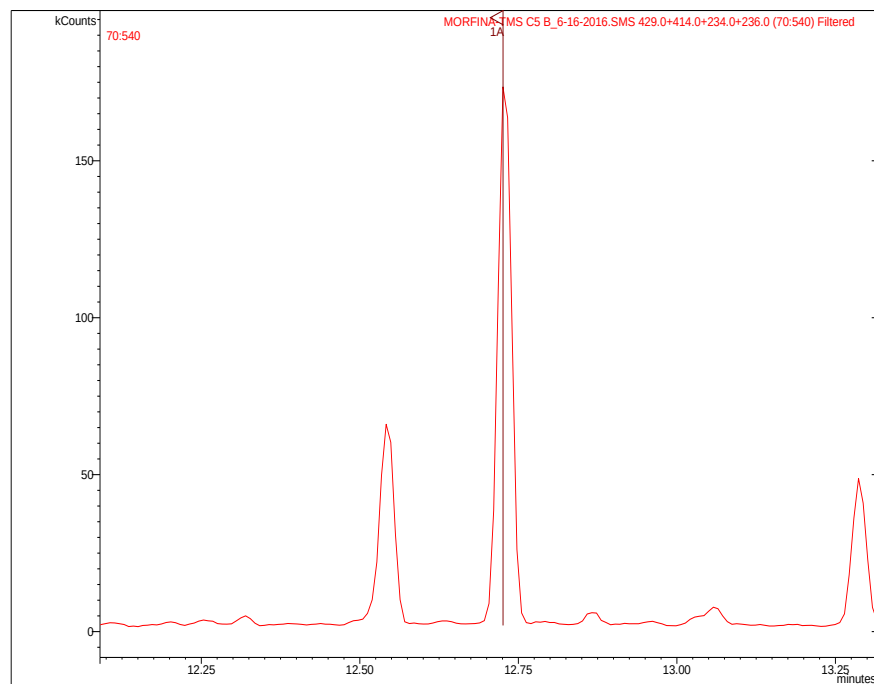


Figura 15: Morfina; RT 12.726

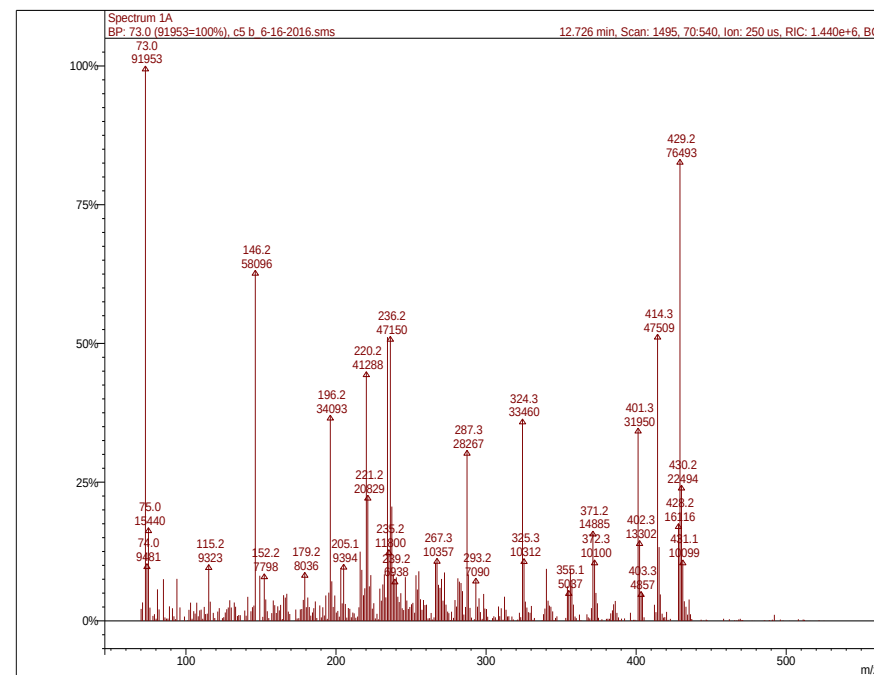


Figura 16: Spettro di massa Morfina; Ioni molecolari 429 - 414 - 236

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

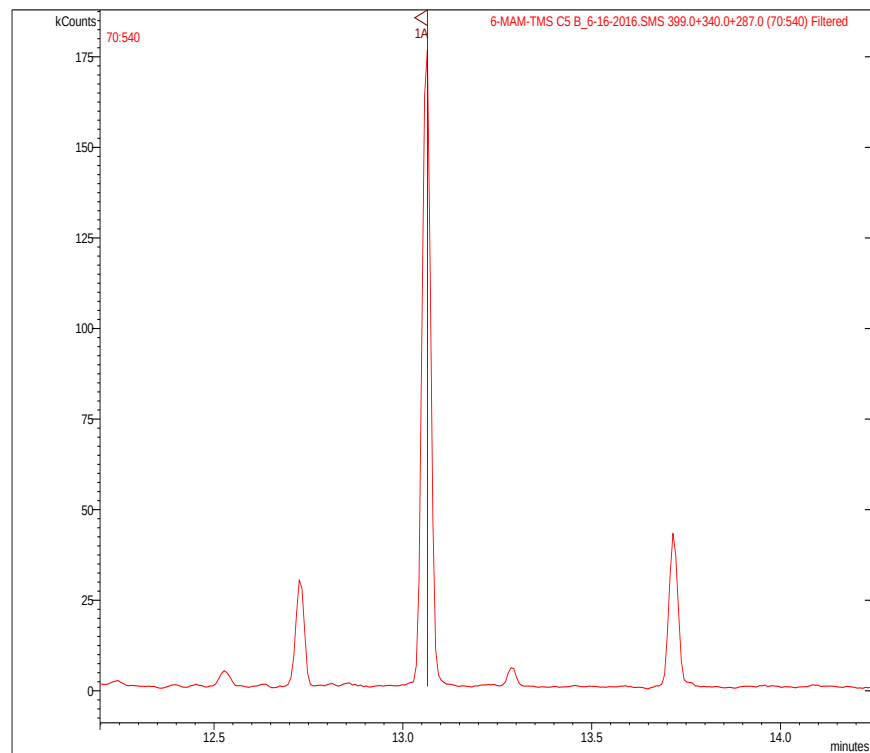


Figura 17: 6-MAM; RT 13.065

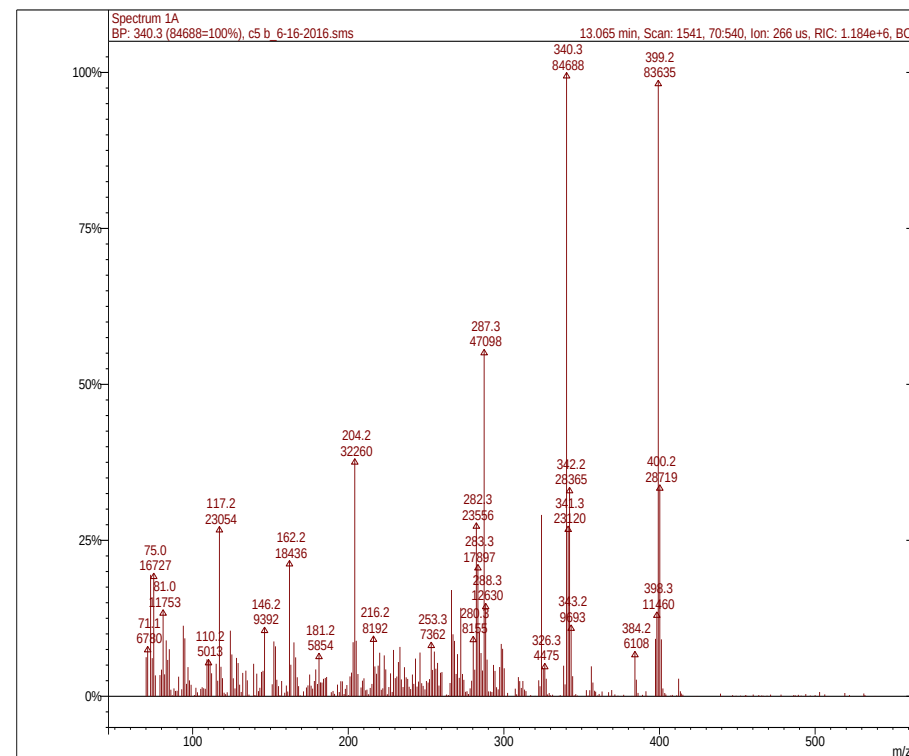


Figura 18: Spettro di massa 6-MAM; Ioni molecolari 399 - 340 - 287

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

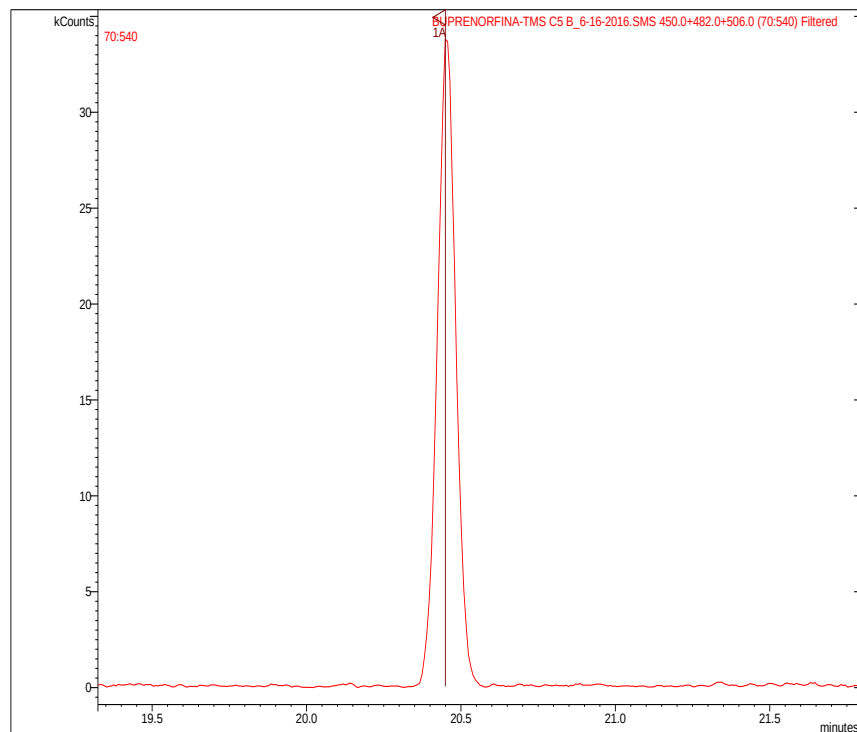


Figura 19: Buprenorfina; RT 20.449

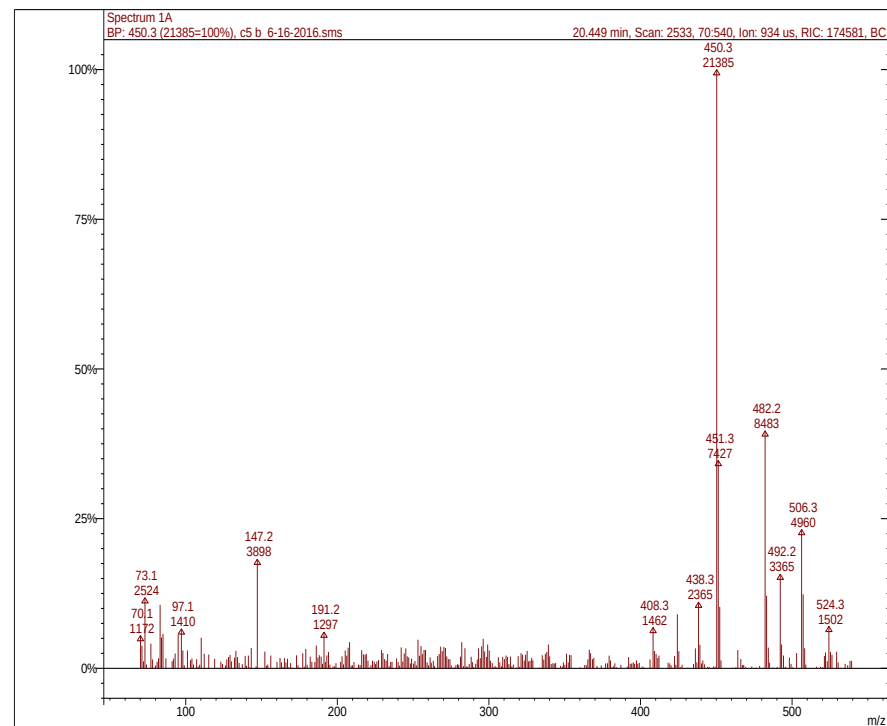
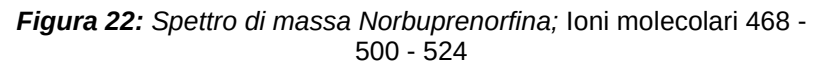


Figura 20: Spettro di massa Buprenorfina; Ioni molecolari 450 - 482 - 506

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)



SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

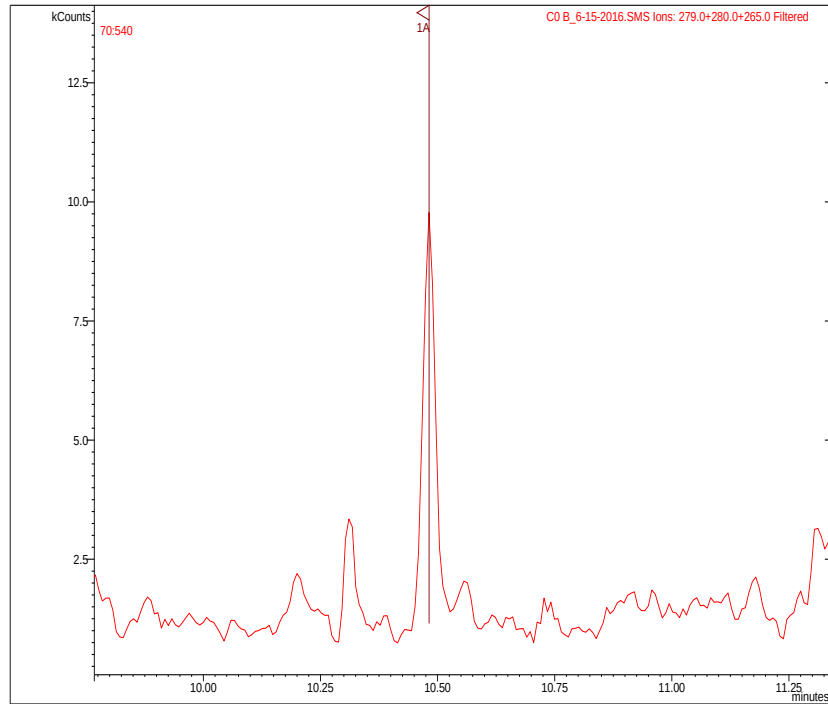


Figura 23: EDDP D3 (IS deuterato); RT 10.482

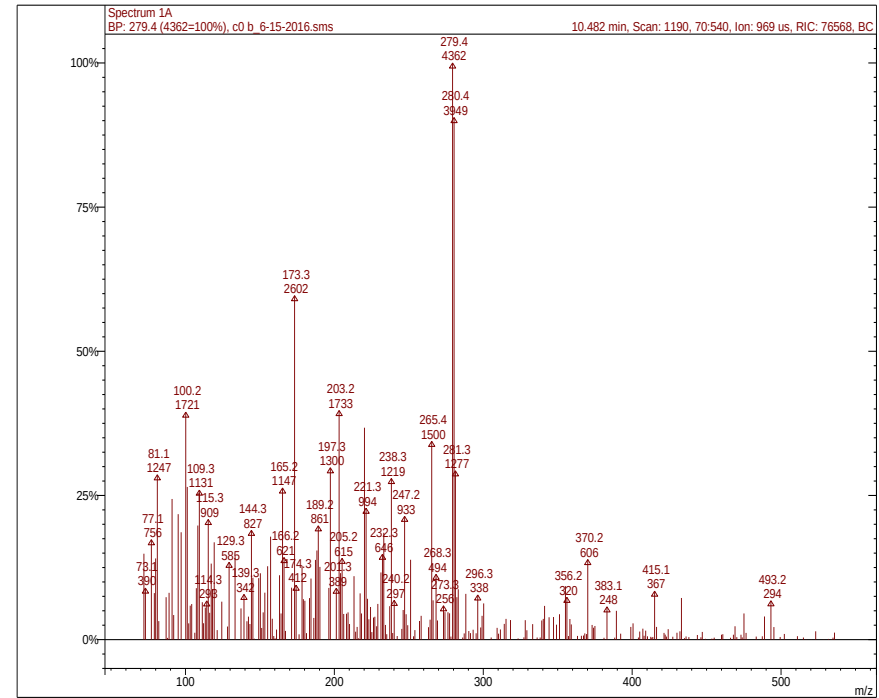


Figura 24: Spettro di massa EDDP D3 (IS deuterato); Ioni
molecolari 279 - 280 - 265

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

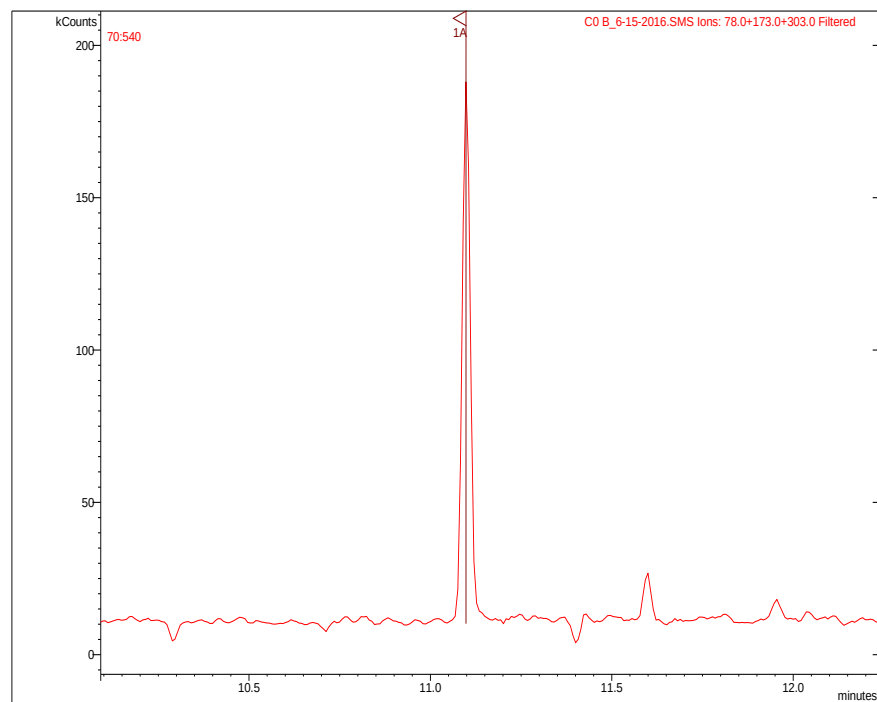


Figura 25: Metadone D9 (IS deuterato); RT 11.098

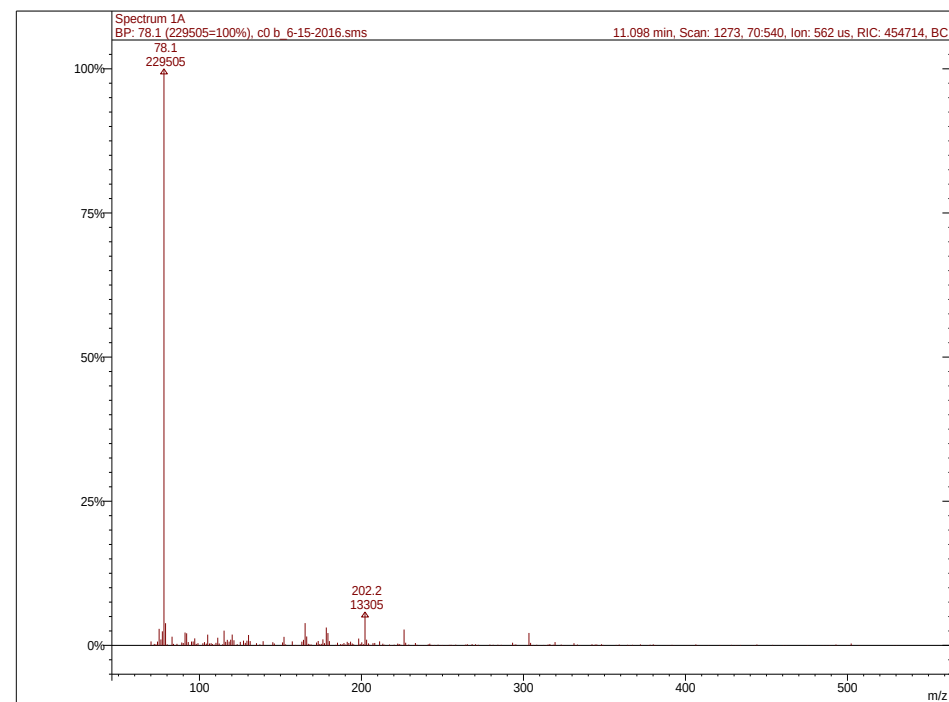


Figura 26: Spettro di massa Metadone D9 (IS deuterato); Ioni molecolari 78 - 173 - 303

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

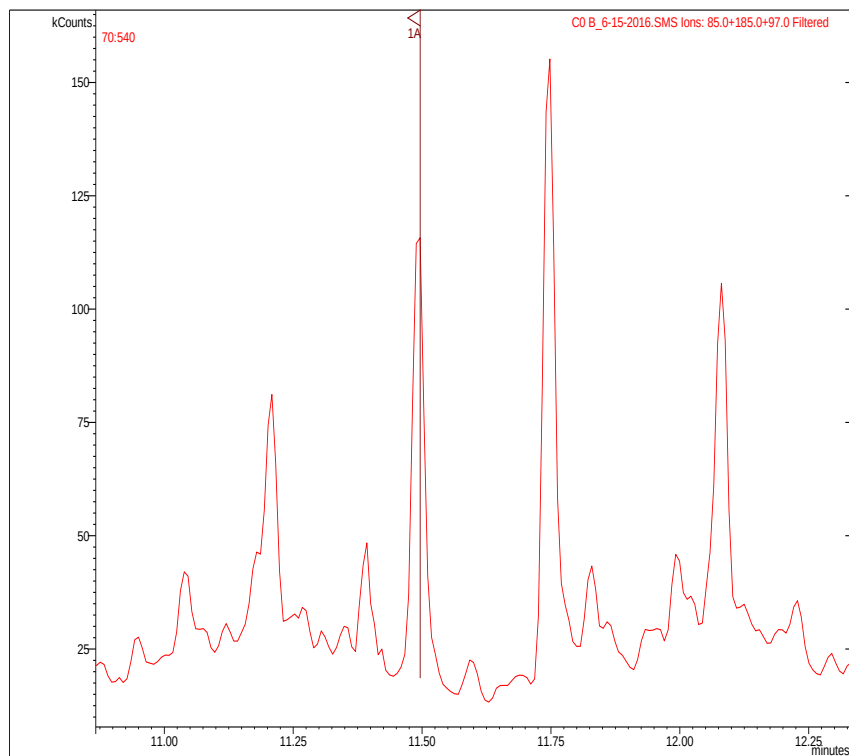


Figura 27: Cocaina D3 (IS deuterato); RT 11.496

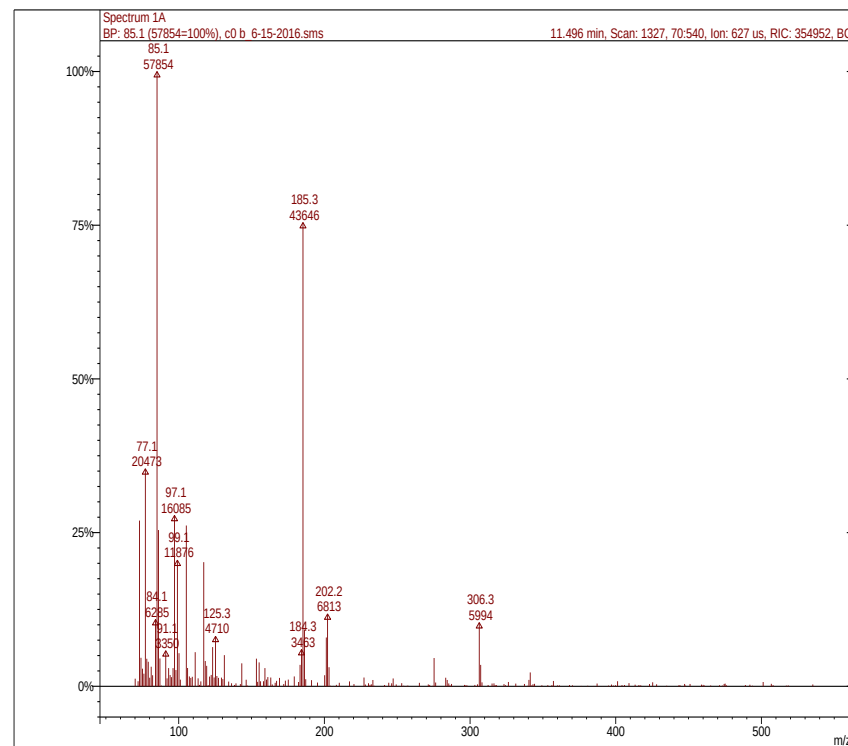


Figura 28: Spettro di massa Cocaina D3 (IS deuterato); Ioni molecolari 85 - 185 - 97

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

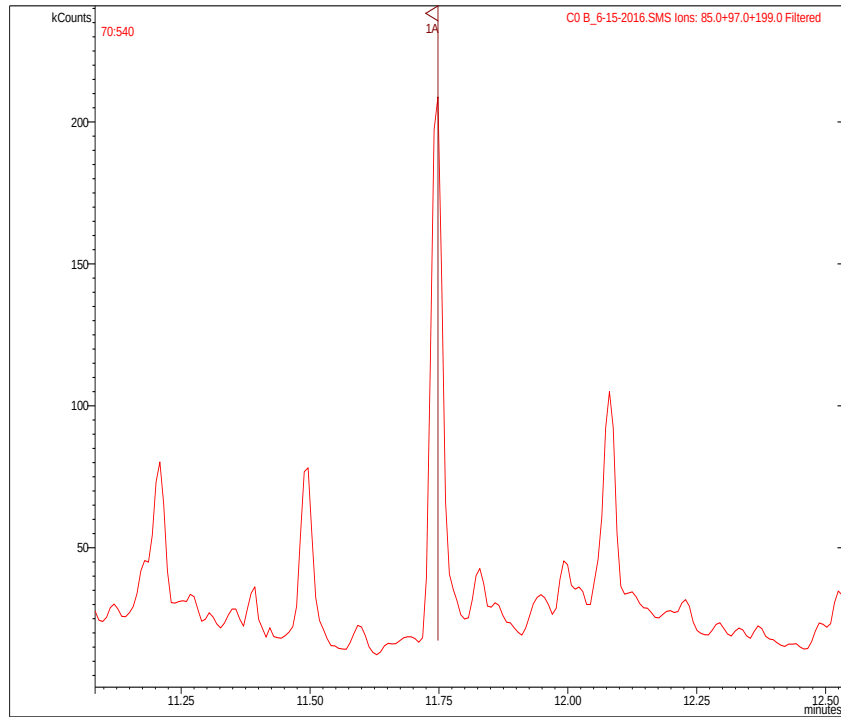


Figura 29: Cocaetilene D3 (IS deuterato); RT 11.748

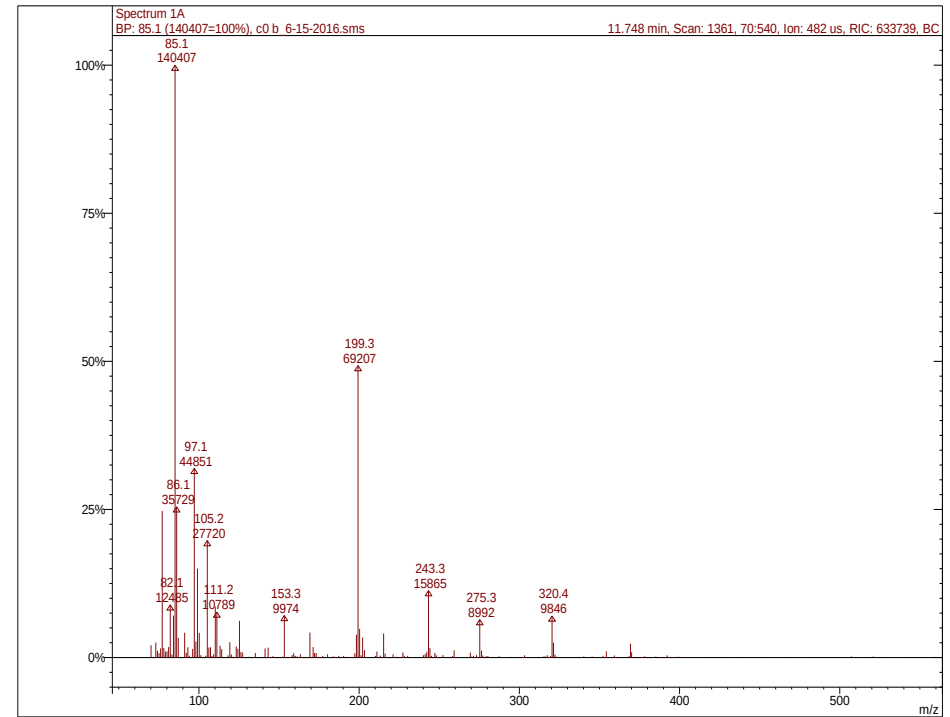


Figura 30: Spettro di massa Cocaetilene D3 (IS deuterato); Ioni molecolari 85 - 97 - 185

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

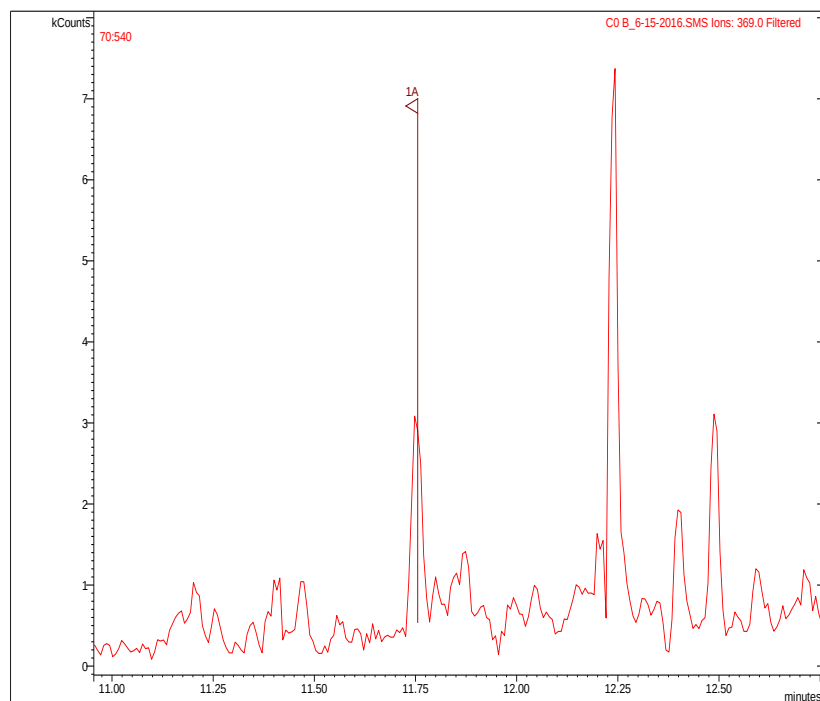


Figura 31: BEG D8 (IS deuterato); RT 11.755

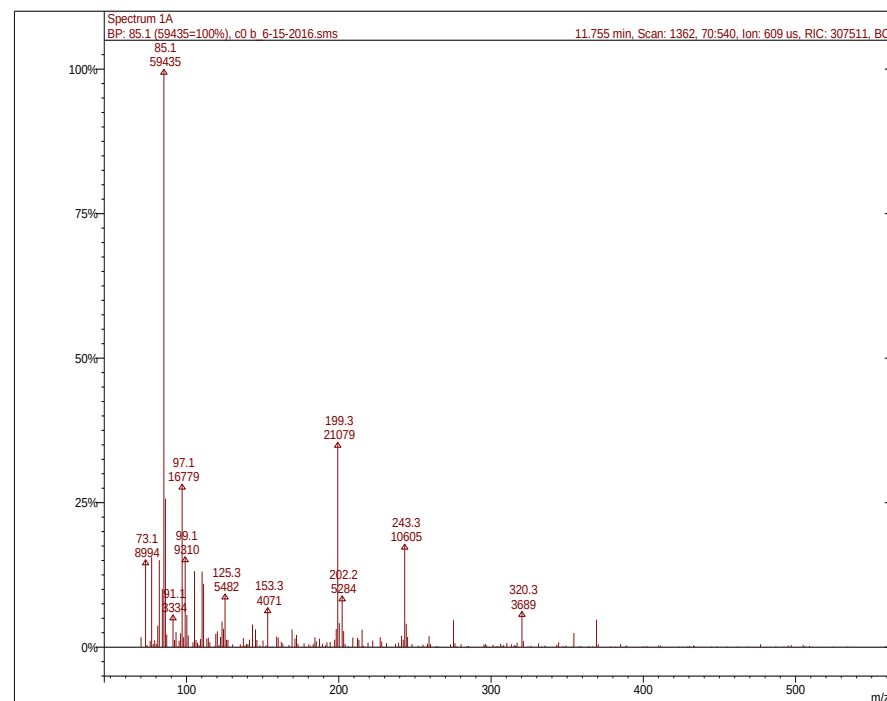


Figura 32: Spettro di massa BEG D8 (IS deuterato); Ioni molecolari 369

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

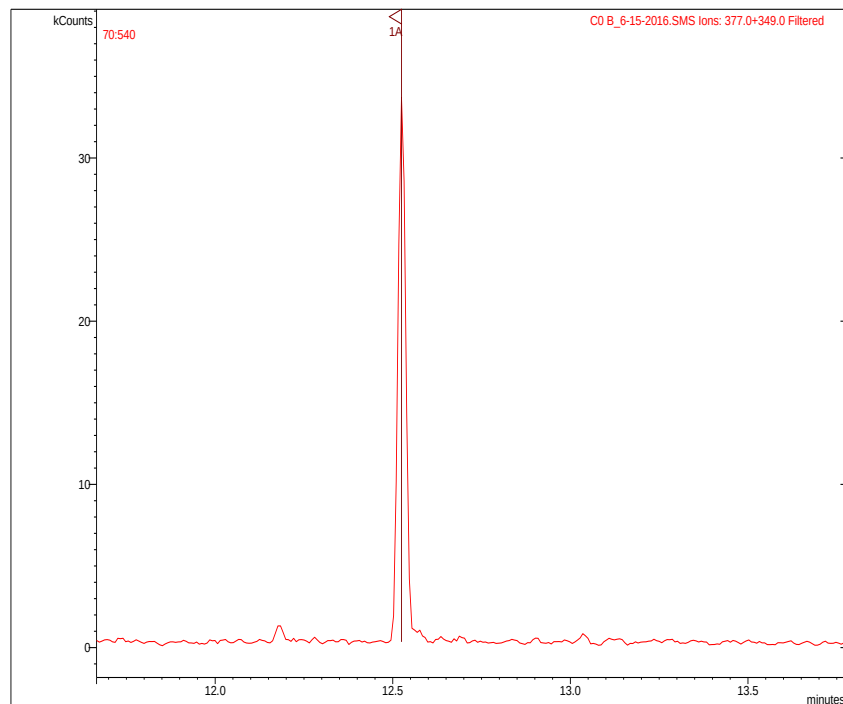


Figura 33: Codeina D6 (IS deuterato); RT 12.525

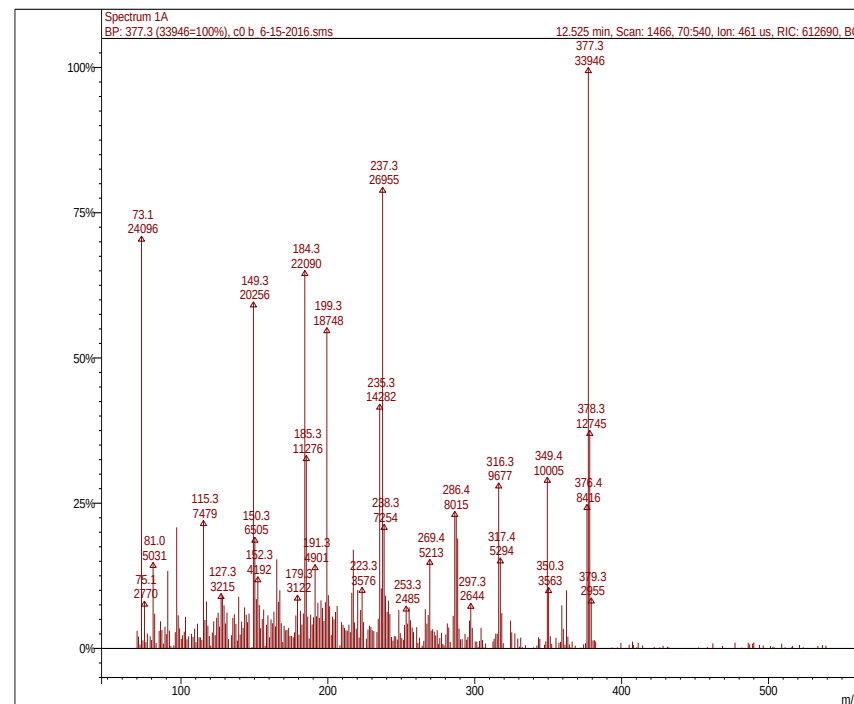


Figura 34: Spettro di massa Codeina D6 (IS deuterato); Ioni molecolari 377 - 349

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

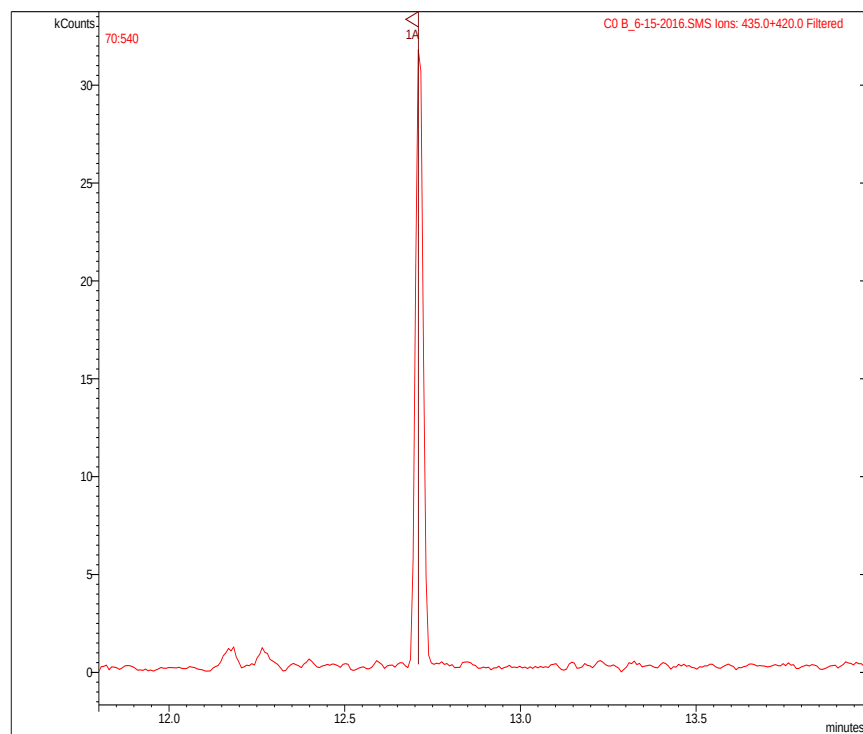


Figura 35: Morfina D6 (IS deuterato); RT 12.709

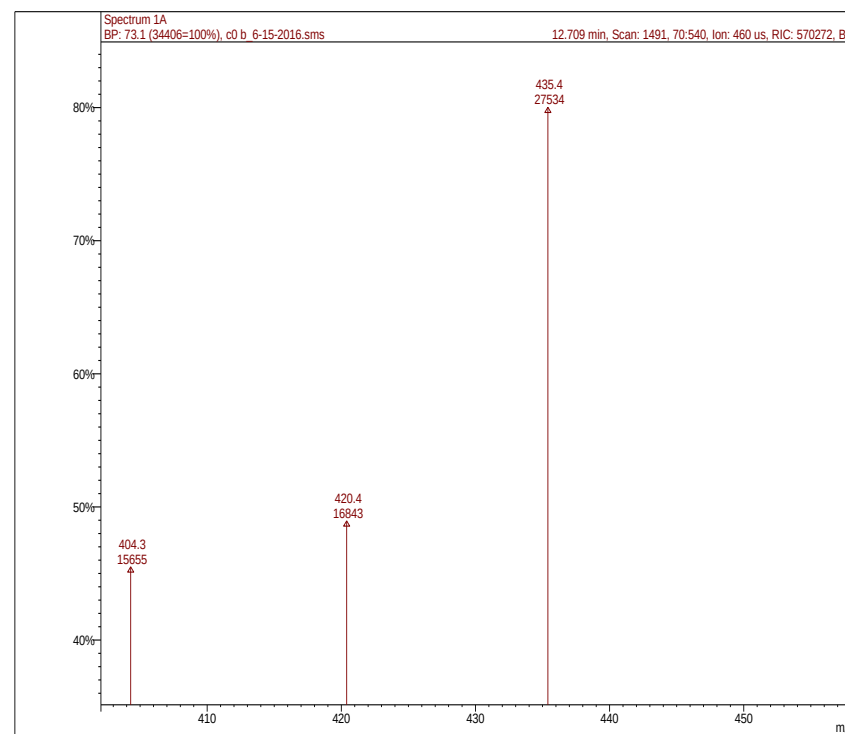


Figura 36: Spettro di massa Morfina D6 (IS deuterato); Ioni molecolari 435 - 420

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

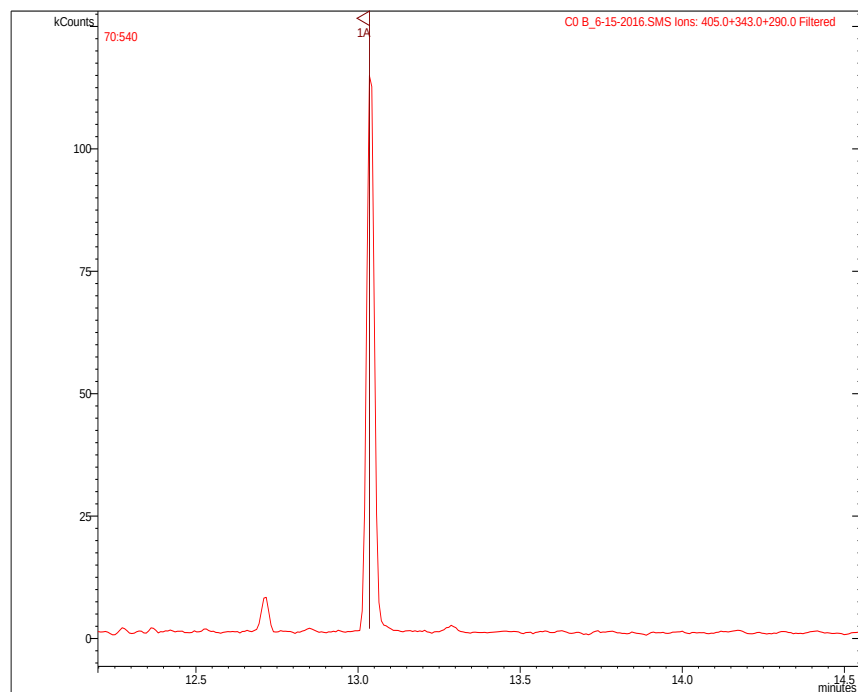


Figura 37: 6-MAM D6 (IS deuterato); RT 13.035

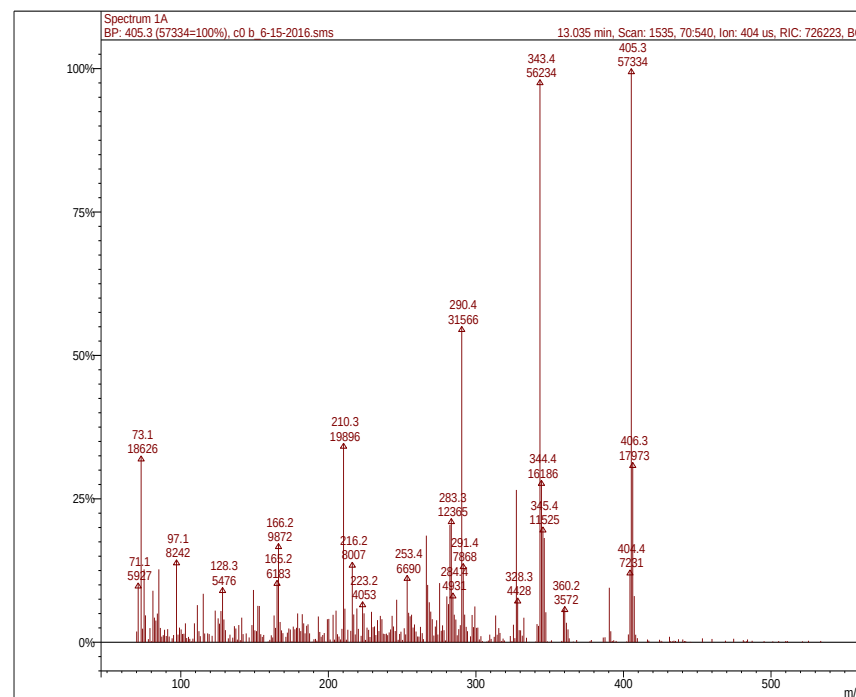


Figura 38: Spettro di massa 6-MAM D6 (IS deuterato); Ioni molecolari 405 - 343 - 290

SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

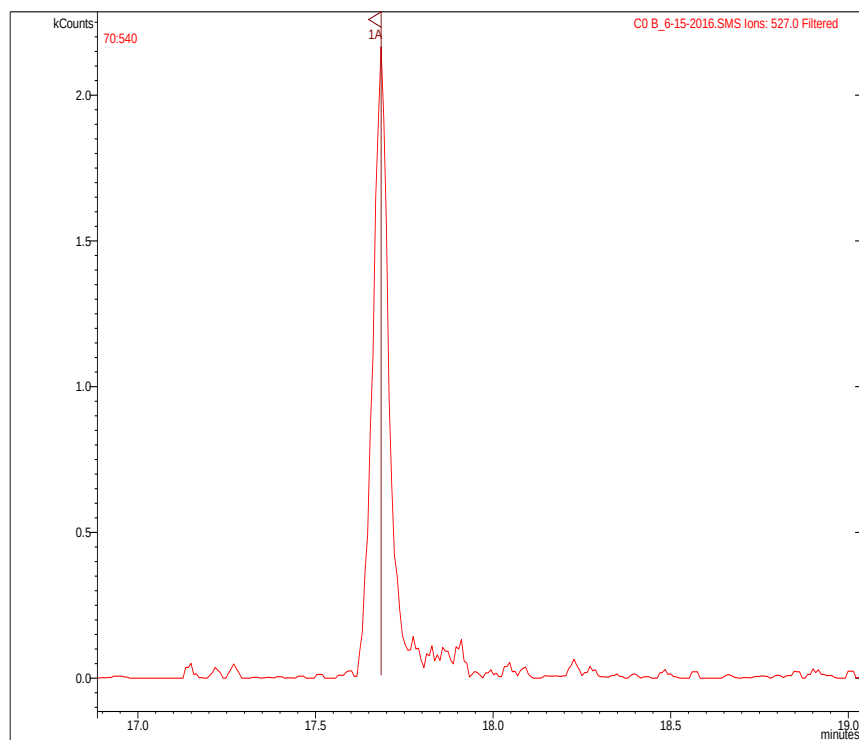


Figura 39: Norbuprenorfina D3 (IS deuterato); RT 17.683

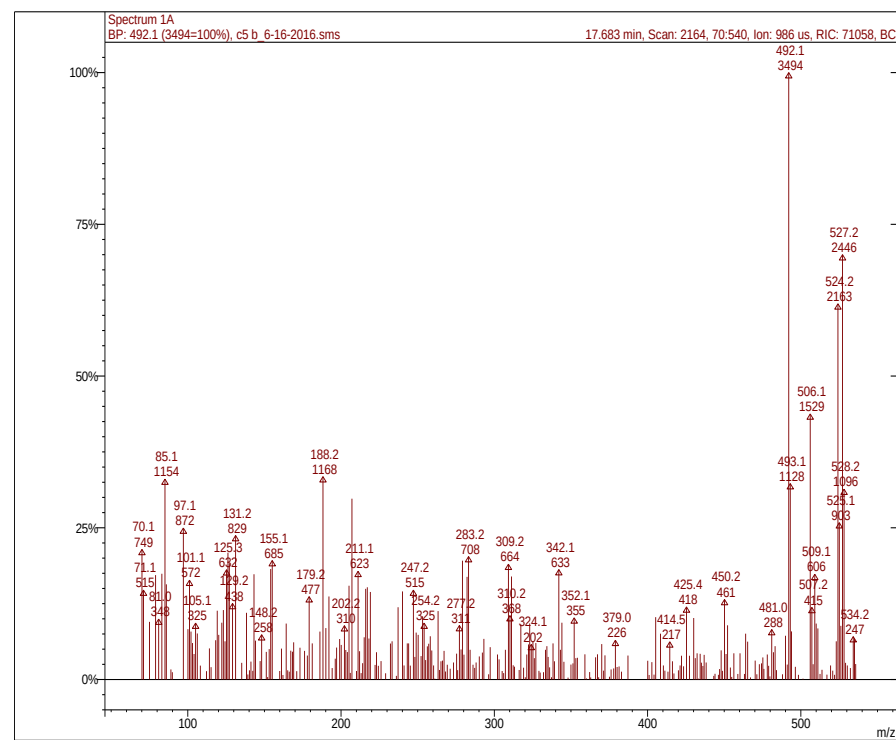


Figura 40: Spettro di massa Norbuprenorfina D3 (IS deuterato); Ioni molecolari 527